Ташкент, 1990 т,1 (часть II), С.221-222.
7. Серебряков Э.П.,Промоненков В.К. Способы получения и свойства метопрена.М.1989 -170 с.
8. Солопов Н.В. Способ культивирования личинок 3-го возраста подкожных оводов..Авт. св-во №1522456 Госреестра СССР 15.07.89.

УДК: 616.981.48-022:599.82:599.9

**В.А. Калашникова**
*(Государственное Учреждение Научно-исследовательский институт Медицинской приматологии РАМН (ГУ НИИ МП РАМН), г. Сочи- А)*

# ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОММЕРЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ АНТИТЕЛ К HELICOBACTER PYLORI

## Введение

На протяжении более чем 20-летней истории изучения хеликобактер пилори-ассоциированной инфекции одной из главных проблем является ее своевременное и достоверное распознавание. Микроорганизмы рода Helicobacter известны как обитатели гастроинтестинального тракта человека и многих видов животных (собаки, кошки, свиньи, грызуны) [7]. Один из представителей этого рода – Helicobacter pylori – обнаруживается в желудке обезьян [3, 4, 7]. Первоначально для диагностики H. pylori использовали бактериологический метод, но он не получил широкого распространения в силу ряда физиологических особенностей возбудителя. Поэтому в настоящее время существуют различные диагностические методы («уреазный», гистологический, ПЦР), позволяющие с достаточно высокой степенью чувствительности и специфичности выявить наличие H. pylori в биосубстратах от больных желудочно-кишечными заболеваниями [2, 5]. Однако эти методы требуют определенного оборудования, длительного времени для получения ответа. В связи с этим, широкое распространение получили серологические методы такие, как РКА, РА, РНГА и другие - быстровыполнимые, основанные на латекс-агглютинации и твердофазном ИФА [1, 6]. Серологические методы основаны на определении уровня антител, которые вырабатываются в ответ на хеликобактерии. При инфицировании Helicobacter pylori первыми появляются IgM, а IgA – через несколько дней в максимальных титрах, что свидетельствует об острой стадии заболевания. Однако клиническая важность IgA антител к H. pylori в сыворотке остается противоречивой и их определение в практике не используется. Через 10-20 дней повышается уровень IgG, который сохраняется, пока присутствует инфекция. Падение уровня антител после излечения происходит через 4-5 месяцев. Поэтому серология также является средством для мониторинга эффективности противомикробного лечения. Недавно были разработаны серологические тесты – «ИммуноКомб II H.pylori IgG» (ЗАО «БИОГРАД», Россия) и «Pyloriset Dry» (Orion Diagnostica, ESPOO, Финляндия) с высокой чувствительностью и специфичностью. В данной работе акцентируется внимание на возможности использования этих тестов для выявления антител к H. pylori у обезьян.

## Материалы и методы

*Сыворотки.* Исследована 171 сыворотка крови, полученная от 15 больных желудочно-кишечными заболеваниями обезьян и от 156 - без клинических признаков заболеваний желудочно-кишечного тракта животных.

В работе использованы коммерческие наборы для определения антител к бактериям Helicobacter pylori в сыворотках и плазме крови человека.

*Тест-система «ИммуноКомб II H. pylori IgG».* Тест-система «ИммуноКомб II H.pylori IgG» представляет собой набор компонентов для количественного определения IgG антител к Helicobacter pylori в сыворотке или плазме крови человека. Это метод непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Твердой фазой является гребень с 12 зубцами. Каждый зубец сенсибилизирован в трех местах: верхняя точка - козьими антитела-

ми к иммуноглобулину человека (внутренний контроль) и нижняя точка - инактивированными антигенами H. pylori. Проявочная ванна имеет 6 рядов (A-F) из 12 ячеек, каждый ряд содержит готовые к использованию растворы реагентов для различных стадий анализа. В ячейках ряда А проявочной ванны происходит специфическое связывание антител с антигенами H. pylori на нижней точке зубца гребня. Одновременно иммуноглобулины, присутствующие в образцах, захватываются антителами к иммуноглобулину человека в верхней точке (внутренний контроль). Несвязанные компоненты смываются в ячейках ряда В. В ячейках ряда С IgG антитела против H. pylori, захваченные зубцами, взаимодействуют с антителами против IgG человека, меченными щелочной фосфатазой. В следующих двух рядах не связавшиеся компоненты удаляются промывкой. В ячейках ряда F связанная щелочная фосфатаза взаимодействует с хромогенным субстратом. Результаты реакции наблюдаются в виде серо-голубых пятен на поверхности зубца гребня.

Перед началом анализа сыворотки разбавляли в соотношении 1:11, добавляли к разбавителю в ячейках ряда А проявочной ванны и перемешивали. В ячейки вставляли гребень, содержащий антигены H. pylori. Реакция шла 30 минут. Затем гребень вставляли в ячейки ряда В, где осуществлялась промывка в течение 2 минут. В ячейках ряда С гребень находился 20 минут (в течение этого времени происходило связывание конъюгата). В ячейках рядов D и E гребень промывали в каждом ряду в течение 2 минут. В ряду F в течение 10 минут шла цветная реакция, после чего гребень снова помещали в ряд Е, где происходила остановка реакции.

Результаты учитывали при анализе положительного контрольного образца, то есть должны были проявиться 2 пятна, анализе отрицательного контрольного образца (проявление верхнего пятна – внутренний контроль) и исследуемых образцов (появление верхнего пятна, что подтверждает внесение образца).

При учете результатов сравнивалась интенсивность окраски нижнего пятна с положительным контролем. Пятно с интенсивностью окрашивания выше, либо равной интенсивности окрашивания положительного контроля указывало на то, что в данном образце IgG антитела к H. pylori присутствовали в низком титре. Проводили также количественный учет результатов путем сравнения интенсивности окрашивания нижнего пятна каждого образца с интенсивностью цветной шкалы «Комб-Скейл».

*Тест-система «Pyloriset Dry».* «Pyloriset Dry» – быстрый тест, основанный на реакции латекс-агглютинации, для определения общего количества антител H. pylori в сыворотке крови. Это латексный реагент, содержащий фракции латекса, сенсибилизированные с частично очищенными и высушенными антигенами H. pylori. Антитела H. pylori, присутствующие в сыво-

Таблица 1

**Сравнение результатов тестов «Иммунокомб» и «Pyloriset Dry»**

| Номер обезьяны | Результаты | |
|---|---|---|
| | «Иммунокомб II H.pylori IgG», ед/мл | «Pyloriset Dry» |
| 2438 | >120 | ++ |
| 35896 | - | + |
| 34125 | - | ++ |
| 35100 | - | - |
| 32324 | - | ++ |
| 34450 | >120 | ++ |
| 26071 | >120 | + |
| 35267 | 40 | ++ |
| 33605 | - | - |
| 33356 | - | + |
| 35335 | - | ++ |

Примечание: «+» - частичная агглютинация; «++» - полная агглютинация.

роточной пробе, реагируют с сенсибилизированными фракциями латекса, приводя к визуально заметному склеиванию. На тестовую карточку добавляли 30 мкл растворяющей буферной жидкости и 10 мкл сыворотки крови. Перемешивали капли с латексным реагентом путем кругообразного поворачивания карточки в течение 3 минут. Результат теста считали реактивным (сыворотка содержит определимое количество H. pylori), если образование скоплений обнаруживалось через 3 минуты. При этом агглютинацию считали полной, если на белом фоне отчетливо были видны красные гранулы или частичной, если гранулы были различимы, но фон оставался темным.

**Результаты и обсуждения**

В результате иммуноферментного анализа, проведенного с помощью тест-системы «ИммуноКомб II H.pylori IgG» антитела IgG к H. pylori выявлены в 33%. При этом в 72,7% IgG были обнаружены в низких титрах (20-60 ед/мл), в то время как в высоких титрах, то есть более 120 ед/мл антитела регистрировались в 21,2%, а в средних титрах (60-120 ед/мл) – в 6,1%.

Методом латекс-агглютинации (тест «Pyloriset Dry») исследован 71 образец сывороток крови обезьян, из которых 49 (69%) дали положительный результат, то есть в данных сыворотках содержались антитела к H. pylori. В подавляющем большинстве случаев (40,9%) отмечалась полная агглютинация, то есть на белом фоне были отчетливо видны красные гранулы. В 93,3% антитела к H. pylori обнаружены в сыворотках крови больных обезьян, а в 62,5% - у клинически здоровых животных.

*Сравнительная характеристика результатов тестов «Pyloriset Dry» и «ИммуноКомб II H.pylori IgG».* Проведен сопоставительный анализ эффективности использования вышеозначенных тестов. Параллельно исследованы 11 сывороток крови обезьян. Результаты сравнения тестов представлены в таблице 1.

Тест «ИммуноКомб II H.pylori IgG» определил 4 положительных образца, в то время как «Pyloriset Dry» - 9. Согласно иммуноферментному анализу в 2 пробах была отрицательная реакция, при этом в «Pyloriset Dry» имела место частичная агглютинация. В 18,2% отмечено совпадение отрицательных результатов. Пять сывороток из 11 (45,6%) в тесте «Pyloriset Dry» дали положительный результат при отрицательном в «ИммуноКомб II H.pylori IgG». Совпадение положительных результатов отмечено в 36,4%.

Таким образом, в результате применения тест-системы «ИммуноКомб II H.pylori IgG» можно получить качественную и количественную оценку содержания иммуноглобулинов класса G, в то время как «Pyloriset Dry» показывает только наличие общего количества антител к хеликобактер пилори. Кроме того, применение этого теста имеет свои ограничения, то есть положительный результат теста не делает различия между активной и пассивной болезнью и не обязательно свидетельствует о желудочно-кишечном расстройстве. При использовании данного теста необходимо опираться на клиническую симптоматику и проводить его в случае заболевания. Отрицательный результат указывает на то, что в исследуемом образце нет определимого количества антител, а такое бывает на ранней стадии развития болезни, до повышения иммунной реакции. «ИммуноКомб II H.pylori IgG» можно применять во всех случаях, когда есть подозрение на присутствие H. pylori в организме, то есть как при гастроинтестинальных синдромах, так и для контроля лечения, а также в профилактике, с целью выявления риска развития Helicobacter pylori-ассоциированных заболеваний. Кроме того, преимуществом данной тест-системы является возможность количественного определения титра IgG, который отражает степень поражения желудка хеликобактериями.

**Выводы**

В процессе работы определены наличие антител и уровни IgG к H. pylori. На основании полученных данных можно считать, что наличие местного антительного ответа на H. pylori у обезьян является косвенным аргументом в пользу суждения о патогенетическом значении этих микроорганизмов при желудочно-кишечных заболеваниях обезьян. Выявление антител к данному возбудителю у клинически здоровых обезьян свидетельствует о возможности легкого течения инфекции, что имеет место практически при всех инфекционных заболеваниях. При сравнении результатов использования тест-систем «ИммуноКомб II H.pylori IgG» и «Pyloriset Dry» мы отдали предпочтение «ИммуноКомб II H.pylori IgG», позволяющей не только быстро (в течение часа) провести качественную реакцию, но и косвенно оценить количество антител к H. pylori у обезьян. Данный набор также позволяет осуществить надежный серологический контроль за инфекцией H. pylori и контроль за эф-

фективностью лечения хеликобактериоза. Тест «Pyloriset Dry» можно использовать для помощи в диагностике инфицирования H. pylori как экспресс-метод. Мы считаем, что коммерческие иммунологические тест-системы «ИммуноКомб II H.pylori IgG» и «Pyloriset Dry», которые разработаны для определения антител к Helicobacter pylori у человека, можно рекомендовать для аналогичного исследования у обезьян.

**SUMMARY**

**The study of antibodies to Helicobacter pylori in monkeys serum was carried out using two commercial kits "ImmunoComb II H.pylori IgG» and "Pyloriset Dry». High percentage of antibodies was determined, but mostly in low titers. Preference is given to "ImmunoComb II H.pylori IgG» kit, which gives qualitative and quantitative assessments of antibodies in the serum. This test allows serological monitoring of Helicobacter pylori infection and control of treatment of helicobacteriosis in animals.**

Литература

1. Белая, Ю.А. Частота встречаемости специфических антигенов Helicobacter pylori при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. / Ю.А. Белая, М.С. Вахрамеева, В.Г. Петрухин, В.М. Бондаренко, О.Ф. Белая, В.В. Евдокимов, Д.М. Курманова, Т.И. Юдина, В.Г. Нестеренко // ж/л микробиол. 2004. № 6. С. 63-69.
2. ДУДК:ин, Т.В. Методы выявления Helicobacter pylori. / Т.В. ДУДК:ин, Н.А. Соловьева, В.Г. Жуховицкий и др.// Росс.гастроэнтерол.журн. 2001. № 2. С. 77-89.
3. Калашникова, В.А. Инфицирование обезьян Helicobacter pylori. / В.А. Калашникова // Ветеринария. 2006. № 7. С. 23-25.
4. Калашникова, В.А. ПЦР-диагностика Helicobacter pylori у обезьян. В.А. Калашникова // Ветеринарная патология. 2006. № 3 (18).С. 57-60.
5. Махова, М.А. Молекулярно-биологические методы в диагностике хеликобактеной инфекции: Автореф. дисс…к.б.н. / М.А. Махова, Москва, 2003. 24 с.
6. Чайка, Н.А. Кампилобактериоз. / Н.А. Чайка, Л.Б. Хазенсон, Ж.П. Бутцлер // М.: «Мед-на», 1988. С. 115-133.
7. Une, J. Helicobacter Species and Helicobacter Infection in Animals. / J. Une // Materials of 28th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, 24-27 okt. 2003, Thailand.

УДК: 579.252.55:615.332:579.25:577.212.3

**В.И. Семенихин, А.С. Донченко, С.А. Юрик**

*(Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, п. Краснообск, Новосибирская область)*

# ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ НЕКРОБАКТЕРИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ С ПОМОЩЬЮ ГНЕЗДОВОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Некробактериоз – широко распространенное инфекционное заболевание, которым болеют все виды животных и птиц, а также и человек. Первичным агентом в возникновении данного заболевания является *Fusobacterium necrophorum* – грамотрицательная, полиморфная, неподвижная палочка, растущая в строго анаэробных условиях, не образующая спор и капсул. Болезнь причиняет экономический ущерб из–за снижения многих показателей, в том числе молочной продуктивности на 5–25%, интенсивности роста на 15–25% [1–3].

Основным способом лабораторной диагностики некробактериоза крупного и мелкого рогатого скота в настоящее время является бактериологическое исследование: микроскопия мазка, посев на питательные среды, биопроба на лабораторных животных. Эти методы диагностики имеют свои минусы. Так, из очагов поражения наряду с *Fusobacterium necrophorum*, обладающей вирулентностью, выделяют и невирулентные биотипы: *Fusobacterium pseudonecrophorum*, находящиеся в рубце, а также атипичные формы, которые никогда не вызывают заболевание, но по морфологическим признакам очень схожи с вирулентными вариантами. Одновременно в больших количествах выделяется сопутствующая микрофлора: стафилококки, стрептококки, микрококки, картофельная, кишечная палочки и другие микроорганизмы. Поэтому выделить возбудителя заболевания сложно. В целом на постановку диагноза затрачивается 12–16 суток, а в